

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09316000  
PUBLICATION DATE : 09-12-97

APPLICATION DATE : 31-05-96  
APPLICATION NUMBER : 08138659

APPLICANT : TOAGOSEI CO LTD;

INVENTOR : SEGAWA TOSHIAKI;

INT.CL. : A61K 39/00

TITLE : VACCINE FOR SUPPRESSING ARTERIALIZATION

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject vaccine containing a specific cell growth factor (segment), excellent in suppressing action on arterialization which participates in proliferation, infiltration and transfer of a solid cancer and useful for treatment of various kinds of diseases including cancer and suppression of onset thereof.

SOLUTION: This vaccine contains a cell growth factor [e.g. an acidic fibroblast growth factor, a basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor or a platelet-derived endothelial cell growth factor, especially a vascular endothelial cell growth factor (VEGF)] or its fragment [a peptide corresponding to epitope of VEGF (e.g. a peptide having an amino acid sequence of TryProAspGluIleGluTryIlePheLys)].

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-316000

(43) 公開日 平成9年(1997)12月9日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/00	ADU		A 6 1 K 39/00	ADUH

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-138659

(22) 出願日 平成8年(1996)5月31日

(71) 出願人 000003034

東亜合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72) 発明者 戸井 雅和

東京都板橋区成増3-37-1-202

(72) 発明者 松本 友恵

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社つくば研究所内

(72) 発明者 浅野 誠

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社つくば研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管新生抑制用ワクチン

(57) 【要約】

【構成】 血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子又はその断片を含む血管新生抑制用ワクチン。

【効果】 本発明の血管新生抑制用ワクチンは、血管新生に起因する疾患の発症抑止効果並びに治療効果を個体に付与することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子又はその断片を含む血管新生抑制用ワクチン。

【請求項2】 細胞増殖因子が血管内皮細胞増殖因子である請求項1記載の血管新生抑制用ワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血管新生抑制用ワクチンに関わるものであり、より詳しくは血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子、特に血管内皮細胞増殖因子を主要抗原成分とした免疫療法剤に関わるものであり、固形癌を初めとする血管新生に起因する各種疾患の治療、発症（再発を含む）抑止等の目的に使用されるものである。

【0002】

【従来の技術】高等動物においては、抗原と称される物質が生体内に入り込んできた場合に抗体と呼ばれる物質を生成する能力が備わっていることが知られている。この目的は自己に害を及ぼす恐れのある物質又は生物、即ち抗原から生体を保護することにある。これは侵入した抗原を特異的に認識し、その抗原を分解、中和、不活性化することによって生体を保護しようとするものである。

【0003】近年の免疫学の著しい進歩によって、侵入してきたあらゆる種類の抗原に対していかに巧妙に特異抗体が生成され、種々の免疫担当細胞が動員され、目的を達するのか、といういわゆる免疫応答の仕組みが次々に明らかにされてきており、その仕組みの巧妙さ及び複雑さには目を見張る物がある。それらについては、例えば、「免疫学」（小山次郎、大沢利昭編集、南江堂発行）等に詳細に説明されている。

【0004】免疫応答機構の最も驚嘆すべき点の一つに、一度侵入した抗原を記憶し、再度同じ抗原が侵入した場合に極めて迅速、有効に免疫応答を誘起するという性質がある。この性質を利用したもので、すでに人類の福祉に貢献している技術がワクチン又は予防接種と呼ばれるものである。旧来、ヒトは一度感染した疫病には二度かかりにくいということが経験的に認知されていたが、これを医療行為に役立てたジェンナーの種痘は、あまりにも有名な出来事である。

【0005】以降ワクチン接種、予防接種は様々な応用をみることになり、予防医学上極めて有効な手段として現在も広く行われている。この技術は、不活性化した感染性生物又は感染性生物の構成物質の一部を予めヒトに接種し擬似感染を成立させることによって、本当の感染時に生体内に記憶された免疫応答を有効に引き出し感染症に対する耐性を発揮させるというものである。

【0006】以上述べてきたようにワクチン技術は感染症分野での極めて有効な手法として発達してきている。

さらに近年の研究の成果により、免疫応答機構は生体内に生ずる各種新生物生成疾患即ち癌の発症に於いても重要な役割を担っているのではないかと考えられるようになってきた。即ちある種の免疫担当細胞は常に生体の全ての細胞と物体とを監視し非自己と判断された細胞を排除する機能を担っており、形質転換を起こした細胞即ち腫瘍細胞の発生もこれら監視機構によって常時チェックされており、発生した腫瘍細胞の多くは悪性な癌となる以前に排除されているのではないかという考えがあり、この機構は癌細胞を傷害するキラーT細胞はじめ単核食細胞マクロファージ、好中球、NK細胞などが司る主に細胞性免疫と呼ばれるしくみによって成り立っていることが明らかとなってきた。

【0007】これらの知見からさらに一步進めて癌免疫を積極的に治療に応用しようという癌免疫療法という考えが提唱されるに至った。その中身としては、上に述べた感染症に対するワクチンと原理的に共通な能動免疫療法、即ち不活性化させた癌細胞やその成分を接種することによって抗癌効果を引き出そうというものや、免疫賦活療法、即ち免疫応答機構そのものを非特異的に活性化させて抗癌免疫効果を高めよう、といったものがあげられる。

【0008】ここに述べたような癌抗原と免疫機構を応用した癌免疫療法は癌治療の新しい試みとして研究されているが、多くの場合癌抗原は各々の癌細胞に特有のものであることや必ずしも全ての癌の系で発現しているとは限らない点、さらには感染症に対する免疫反応のような強い効果が得られないことや、癌細胞自体が癌免疫の成立を逃れる機構を有している場合があることなどの問題点を有しており、一般的な療法としての有用性は今後の進展を待たねば結論できないものである。

【0009】腫瘍の治療法として現在広く用いられているものの多くは、化学療法であれ、放射線療法であれ上述の癌免疫療法であれ腫瘍細胞そのものをターゲットとしたものがほとんどである。薬剤の投与による腫瘍に対する選択的攻撃は、腫瘍細胞が他の正常な細胞に比べてはるかに活発に分裂、増殖を繰り返しているという性状に依るところが大きい。即ち細胞の増殖機構そのものを破壊、ないしは阻害することによって標的細胞を殺すという目的を達成するものである。

【0010】一方、固形腫瘍の増殖を抑制する方法に、その栄養ならびに酸素の供給源を断つ、いわゆる兵糧攻めのアイディアが提唱されてきた。即ち腫瘍細胞そのものを攻撃することなく、栄養や酸素の枯渇状態におとし入れ、結果として腫瘍の増殖抑止、そして退縮という治療効果をあげるというものである。この手法の具体的な標的として、腫瘍に到達している血管があげられる。

【0011】一般に細胞が悪性転化し癌細胞が発生したとしても、その増殖は初期においては非常にゆっくりしたものであると言われている。報告によると発生した腫

瘍は血管の到達無しには直径2mm以上には増殖しないとされている(M. A. Gimbrone et al., J. Exp. Med. 136, 261, 1972)。ところがこの病変部位にひとたび血管が到達すると、無尽蔵な栄養と酸素の供給を得た腫瘍は爆発的に増殖を開始するのみならず、その血管を介して遠隔転移なども起こすことになる。このことが血管新生は腫瘍の進行、転移と切っても切れない関係にあると言われる由縁である。癌細胞が発生するとそれに向かって周囲の血管から新たに分岐した新生血管が癌細胞に向かって遊走することが観察されており、この現象から癌細胞は血管の新生、遊走を誘起するなんらかの因子を出しているのではないかと考えられるようになり、癌血管新生因子(Tumor Angiogenesis Factor:TAF)の存在が提唱されてきた(J. Folkman, Cancer Research 46, 467, 1986)。

【0012】一方、血管の新生を誘起する、あるいは血管の構成細胞である血管内皮細胞の増殖を促進させる物質として、酸性線維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor:aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor:bFGF)、上皮増殖因子(Epidermal growth factor:EGF)、血小板由来内皮細胞増殖因子(platelet-driven endothelial cell growth factor:PD-ECGF)、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability:VEGF/VPF)、胎盤由来増殖因子(Placenta growth factor:PIGF)等多くの物質が報告されているが(revised R. Bicknell and A.L. Harris, Eur. J. Cancer 27, 6, 781, 1991)、これらのどの物質がどのような機作で前述のTAFの作用を担っているのかは判っていない。本発明者らは、これら因子の中でVEGF/VPFが細胞外分泌に係わるシグナルペプチドを有すること、ならびにテストしたほとんど全ての癌細胞で発現が見られることに注目し、VEGF/VPFが腫瘍血管新生になんらかの係わりが有るのではないかとこの仮説をたて研究を行った。その結果VEGF/VPFの作用は腫瘍細胞そのものに対してではなく血管内皮細胞特異的に発揮され、生体内では血管の新生を促すことがわかった。さらにはこのVEGF/VPFの作用を抗VEGF/VPFポリクローナル抗体で抑制することによって生体内での腫瘍の増殖を抑えることが出来ることを見いだした(S. Kondo et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 194, 1234, 1993)。又、それに先だって米国のKimらは、抗VEGF/VPF中和モノクローナル抗体によって生体内での腫瘍の増殖を抑制することができることを示した(K. J. Kim et al., Nature 362, 841, 1993)。これらの結果はVEGF/VPFと特異的に結合しその働きを妨害する、いわゆる液性免疫成分である抗体を生体内に投与する事によって腫瘍の増殖を抑制できることを示したものである。

【0013】そこで本発明者らは、ウサギやマウスを免疫する事によって得た抗VEGF/VPF抗体を他の個体に投与

することによって抗腫瘍性が得られるのであれば、腫瘍を発生する個体そのものの免疫系をVEGF/VPFを抗原として刺激することによって、当該個体由来の抗VEGF/VPF抗体を生成させ、結果として当該個体に抗腫瘍性を付与でき、ひいては当該個体に血管新生を抑制する活性を付与できるのではないかと考え研究を行ったのである。

#### 【0014】

【発明が解決しようとする課題】即ち、本発明者らは、生体に備わった免疫応答機構をより広く癌の治療に応用するべく、固形癌の増殖、浸潤、転移に深く関与するとされる血管の新生機構に着目し血管新生を抑制できるワクチンについての研究を行い、癌を始めとする各種の疾患の治療・発症抑制等に適用できる本発明を完成したのである。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子又はその断片を含む血管新生抑制用ワクチンに関するものである。上記細胞増殖因子としては血管内皮細胞増殖因子又は血管透過性因子と称されている因子が挙げられる。なお、以下、血管透過性因子(Vascular Permeability Factor)はVPFと、血管内皮細胞増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor)はVEGFと、それぞれ略す。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】本発明の血管新生抑制用ワクチンは、個体に血管新生を抑制する活性を付与することができ、ひいては血管新生が関与する疾病を治療及び予防すること、特に固形腫瘍の発症抑止効果並びに抗腫瘍効果を個体に付与することができるものである。本発明における血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子としては、前記した下記のものが例として挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0017】即ち、酸性線維芽細胞増殖因子(acidic fibroblast growth factor:aFGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor:bFGF)、上皮増殖因子(Epidermal growth factor:EGF)、血小板由来内皮細胞増殖因子(platelet-driven endothelial cell growth factor:PD-ECGF)、血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability:VEGF/VPF)、胎盤由来増殖因子(Placenta growth factor:PIGF)等である。

【0018】又、それらの断片としては、それぞれの因子のポリペプチドから誘導されるものや化学合成によって作成された当該因子のアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドであって、当該因子に対する免疫抗体を作らし得るものが挙げられる。なお、血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子の一つであるVEGFのエピトープに相当するペプチドの一部(例えば、TryProAspGluIleGluTryIlePheIyeのアミノ酸配列を

有するペプチド)は既に本発明者らによって見いだされ、特願平6-125569号等に記載されている。

【0019】これらの中でも、特にVEGF/VPFは腫瘍血管新生に於いて主要な役割を担う因子であり、かつ多くの腫瘍細胞によって分泌されていると考えられるようになってきたものであり、VEGF/VPFを抗原とするワクチンは固形癌一般に対してその増殖、転移を抑制する効果が期待できる免疫療法薬剤である。さらに、VEGF/VPFを抗原としてワクチン接種を行うことの優位性としては以下のようなことが挙げられる。

【0020】先ず第一に、前記したように腫瘍の発生には血管新生が必須であると考えられており、血管新生無しには腫瘍増殖は極めて緩慢であり、かつ生育する大きさにも上限があるという点にある。即ち固形癌発症の必須項目である腫瘍血管新生を予め個体をVEGF/VPFで免疫しておくことによって完全に止めるまでもなく遅れさせることができ、結果として発生した腫瘍細胞が死滅することがないにせよ疾病としての癌発症と認識されるまでには膨大な時間が稼げることになる。例えば、生体内のある細胞が形質転換を起こし、突然変異を起こしながら分裂を続け、最終的に血管の新生を伴った癌という疾病に進展するのに数年から数十年の時間を要するとされているが、この期間を数倍に伸ばすことができれば、細胞変異の発生から疾病としての癌成立までにヒトの寿命に対してかなりの期間が必要となり、特殊な例を除いて癌発症が中高年に集中していることを考えれば、この期間延長の意味は極めて大きく、本発明によれば、病気としての癌に有効であるために完璧な作用を要さないということになり、他の療法に比べて寛容度の大きいものとなるのである。

【0021】第二に、上に述べた発症抑止効果に加えて、癌の退縮効果をも期待できる点である。実験的に担癌動物に抗VEGF/VPF抗体を投与することによって得られる効果の大部分は、抗体投与によってVEGF/VPF活性が中和されることによるものであると考えられ、この様な効果は生体内での投与/抗体の存在量に依存しており、多くの場合蛋白性の高分子の生体内半減期は短いことから、一過性のものであると考えられる。従って抗体投与による治療にはしばしば反復投与が行われている。

【0022】一方本発明による場合は理論的に抗体は生体内で供給されることからその効果は持続性であると考えられ、VEGF/VPFの中和効果は継続して発揮されることが期待できるものである。さらに、本発明によればワクチン接種された個体に抗原刺激に対する一連の免疫応答がもれなく備わっていることが予想され、抗体によるVEGF/VPF活性の中和効果にとどまらず、細胞性免疫機構から補体活性化機構までを含んだ免疫応答が抗原提示細胞に対して発動されることが期待される。生体内で腫瘍が増殖する状況でVEGF/VPF抗原を提示する細胞としては、種々の免疫組織染色の結果から、VEGF/VPFを産生する腫

瘍細胞そのものに加え、VEGF/VPFを細胞表面受容体に結合させた腫瘍血管の内皮細胞が知られている。すなわち腫瘍免疫の攻撃対象として、腫瘍細胞そのもの、さらにはその腫瘍に酸素や栄養素を供給している腫瘍血管細胞が考えられることになる。これらの結果として腫瘍血管の新生抑止作用に加えて、既に形成されている腫瘍そのものやその腫瘍血管を直接の標的とする腫瘍壊死効果も得られることが期待される。

【0023】本発明のワクチンは、上記した固形腫瘍を始めとして血管新生が関与する疾病の治療及び予防に適用することができるものである。例えば、アテローム性動脈硬化病の血管新生をこのワクチンにより抑制し、治療することができる。又、高脂血症の人に投与することによりアテローム性動脈硬化病の発症を抑制することができ、心筋梗塞や脳梗塞の発症を予防することができる。さらに、慢性関節リウマチは関節内に血管が新生することにより発症する疾患であり、この症状は、この血管新生が進むことにより憎悪するのであるが、慢性関節リウマチの患者にこのワクチンを投与することにより、症状の憎悪を抑制することが期待できるうえ、慢性関節リウマチの発症の原因も血管新生と考えられるため治療にもつながるものと期待されるものである。又、糖尿病性網膜症にVPFが関与していることはすでに報告されいるとおりであり、糖尿病患者に対して、このワクチンを投与すると、糖尿病性網膜症や腎症の発症を抑制することが期待できるものである。

【0024】その他、血管新生が関与する疾病として網膜中心静脈閉塞症、後水晶体線維増殖症、緑内障、老人性円板状黄斑変性症、眼腫瘍、トラコーマ、未熟児網膜症、角膜移植に伴う血管新生、乾せん、化膿性肉芽腫瘍、血管腫、肥大性はん痕、肉芽及び浮腫性硬化症状等が挙げられ、本発明のワクチンはこれらの疾病の治療及び予防が期待できるものである。また、VEGFはVPF活性、すなわち物質の透過促進活性を有しているので本発明のワクチンは腹水や胸水などの貯溜を抑制することが期待できるものである。

#### 【0025】

【実施例】以下にバキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞で発現させたヒトVEGF/VPF121を抗原に、フロイントのコンプリートアジュバントをアジュバントとして用いた実施例を述べるが、本発明は、抗原、アジュバントにこの様なものを用いた場合に限定されるものではない。例えば、VEGF/VPF抗原としてはヒト以外の動物種由来のVEGF/VPF、ヒト由来であっても121アミノ酸残基数以外の長さのVEGF/VPF、上記方法以外の方法で調製した各種VEGF/VPF、さらには化学合成によって作成されたVEGF/VPFアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドで免疫抗体を作らし得るものが含まれる。なお、ヒトVEGF/VPF121は配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0026】アジュバントとしては百日咳菌ワクチン、溶連菌製剤、内毒素リポ多糖体、BCG、水酸化アルミニウム等があげられる。又、生体内での抗原性の増強のためにVEGF/VPFを熱や酸などによって変性させたもの、あるいはVEGF/VPFを他の蛋白や高分子物質と結合させたもの、さらには他の蛋白と融合させたキメラ蛋白なども用いられる。また、ワクチン接種法もこの実施例に限定されるものではない。免疫応答増強のため、例えば顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulate factor: GM-CSF) やインターロイキン2(interleukin-2)などの種々サイトカインの投与も合わせて行う方法や、被投与者の抗原提示細胞を培養し、抗原を取り込ませたのち被投与者に投与する方法等も用いられる。

【0027】〔実施例1〕 ワクチン接種したマウスへの癌増殖抑制実験

本発明ワクチンの腫瘍増殖抑制への効果を見るために、マウス(C57BL/6)にワクチン接種を行い、抗VEGF/VPF抗体価の上昇を確認した後にマウスLewis肺癌(LLC)を移植し、ワクチン接種群と非接種群とでLLCの増殖を比較した。

【0028】ワクチン接種

8週令の雄マウス(C57BL/6)5匹に、初回(0週)は0.02mg/mouseのVEGF/VPFを0.1mlのフロイントのコンプリートアジュバント[Freund's complete adjuvant (DIFCO製)]と共に全容量0.2mlにて腹腔内に、2回目(1週)と3回目(2週)は0.02mg/mouseのVEGF/VPFを0.1mlのフロイントのインコンプリートアジュバント[Freund's incomplete adjuvant (DIFCO製)]と共に全容量0.2mlにて腹腔内に、それぞれ投与した(ワクチン接種群)。対照として初回(0週)にフロイントのインコンプリートアジュバント0.1mlを水と共に全容量0.2mlにて腹腔内に、2回目(1週)と3回目(2週)はフロイントのインコンプリートアジュバントを水と共に全容量0.2mlにて腹腔内に投与した群(アジュバント対照群)、とリン酸緩衝液生理食塩水(PBS)0.2mlのみを初回(0週)、2回目(1週)と3回目(2週)に腹腔内に投与した群(バッファ対照群)とを準備した。

【0029】抗体価の推移

ワクチンを接種することによって末梢血中の抗VEGF/VPF抗体価が上昇しているかどうか(抗体陽性化:すなわちワクチンによる陽転)を調べる目的で、それぞれの群の各個体から0、1、2、3、5、7、9週に部分採血を行い、血中の抗VEGF/VPF抗体価を調べた。すなわち採取した末梢血を直ちに遠心分離し血漿を得、血漿を0.1%BSA-PBS(0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液生理食塩水)で1000倍に希釈し、VEGF/VPF蛋白を固定化してある樹脂イムノアッセイプレートに0.1mlずつ分注し、固定化してあるVEGF/VPF蛋白に抗VEGF/VPF抗体を特異的に結合させた。結合した抗VEGF/VPF抗体量を予め酵素標

識した抗マウスIgG抗体を使って検出した(いわゆる広く行われている酵素免疫測定法によった)。かかる方法によって調べられた各マウスの血中抗VEGF/VPF抗体価の平均値の推移を図1に示す。すなわち、図1はワクチン接種したマウスに於けるマウス血中抗VEGF/VPF抗体価の平均値の推移をワクチン接種群(●)、アジュバント対照群(○)、バッファ対照群(△)それぞれについてプロットしたグラフを示すものである。この図からワクチン接種群では7週目を頂点とした顕著な抗体価の上昇が観察され、一方バッファ対照群では全ての期間に渡って全く変化は観察されなかった。アジュバント対照群では7、9週目に緩やかな抗体価の上昇が観察されたが、これはフロイントのアジュバントの備え持つ性質である免疫反応の非特異的活性化の影響であろうと考えられた。

【0030】固形癌移植と増殖の追跡

末梢血中の抗体価は第7週目に頂点を越えたと考えられたため、9週目にマウスLewis肺癌(LLC)固形癌の移植を行い、以降癌の増殖を追跡した。予め別のマウスの中で十分に生育させておいたLLC固形癌を3×3×3mmの大きさに切り揃え、1群5匹のワクチン接種群、アジュバント対照群、バッファ対照群のマウス皮下に移植した。

【0031】癌の増殖は移植後6、9、13日目に測定し、腫瘍容積=短径×短径×長径÷2の計算方法で求めた。それぞれの群における癌の増殖の平均値の推移を図2に示す。すなわち、図2はワクチン接種したマウスへの癌移植実験に於ける癌の増殖の平均値の推移をワクチン接種群(●)、アジュバント対照群(○)、バッファ対照群(△)それぞれについてプロットしたグラフである。この図からワクチン接種群では他の群に比べて顕著な増殖の抑制が観察された。

【0032】統計解析

観察されたワクチン接種群における増殖抑制が統計学上有意な差であるのかどうかをスチューデントのT-テスト(Student's t-test)にて検定した。その結果6、9、13日目何れの時点においてもワクチン接種群はバッファ対照群、アジュバント対照群いずれに対しても有意に増殖が抑制されている状態であるという結果となった(p<0.05:有意)。バッファ対照群とアジュバント対照群との比較では、アジュバント対照群の方が若干増殖が遅いように見受けられたが、統計学上の有意差は見い出されなかった。以上の研究結果から、本発明すなわちVEGF/VPFを主成分とする癌ワクチンはマウスにおける固形癌移植のモデル系においてその有効性を示すことが明らかとなった。

【0033】〔実施例2〕 ワクチン接種したマウスへの癌転移抑制実験

本発明ワクチンの腫瘍転移抑制への効果を見るために、マウス(C57BL/6)にワクチン接種を行い、抗VEGF/VPF抗

体価の上昇を確認した後にマウス固形癌(B16F1)を尾静脈より接種し、ワクチン接種群と非接種群とで肺に形成された転移巣の数を比較した。

#### 【0034】ワクチン接種

8週令の雄マウス(C57BL/6)10匹に実施例1と同様にワクチン接種を行い、対照も同様に、アジュバント対照群とバッファ対照群とを準備した。

#### 【0035】抗体価の推移

ワクチン接種マウスの抗体価の推移が実施例1と同様であるかを確認するため、5週(抗体価の顕著な上昇が観察された時点)と9週(抗体価の低下が観察された時点)に部分採血を行い、実施例1に示した方法で血中の抗VEGF/VPF抗体価を調べた。各マウスの血中の抗VEGF/VPF抗体価の平均値の推移を図3に示す。すなわち、図3はワクチン接種したマウスに於けるマウス血中抗VEGF/VPF抗体価の平均値の推移をワクチン接種群(■)、アジュバント対照群(●)、バッファ対照群(△)それぞれについてプロットしたグラフである。この図から、ワクチン接種群の抗体価は5週目では著しい上昇が、9週目には低下が観察され、ワクチン接種マウスの抗体価の推移は実施例1と同様であることが確認された。

#### 【0036】固形癌細胞の接種と転移巣数

9週目に、DMEM 10%FBSを用いて培養したB16F1細胞を $5 \times 10^5$ 個/mlになるよう調製し、これを0.2mlずつ(1×10<sup>5</sup>個/マウス)、1群10匹のワクチン接種群、アジュバント対照群、バッファ対照群のマウスの尾静脈より血管内投与を行い、11週目に肺への生着コロニー数を測定した。それぞれの群における生着コロニー数の平均値を図4に示す。すなわち、この図はワクチン接種したマウスへの癌転移実験に於ける癌の生着コロニー数の平均値をワクチン接種群、アジュバント対照群、バッファ対照群それぞれについてプロットしたグラフである。この図からワクチン接種群では他の群に比べて顕著な転移抑制効果が観察された。

#### 【0037】統計解析

観察されたワクチン接種群における癌の転移抑制効果が統計上有意な差であるのかどうかをスチューデントのT-テストにて検定した。その結果、ワクチン接種群はアジュバント対照群、バッファ対照群いずれに対しても有意に転移が抑制されていることが解った(アジュバント対照群  $p < 0.05$ ; 有意、バッファ対照群  $p < 0.001$ ; 有意)。アジュバント対照群とバッファ対照群との比較では、アジュバント対照群の方が若干転移巣が少ないように見受けられたが、統計学上の有意差は見い出されなかった。

#### 【0038】〔実施例3〕 ワクチン接種したマウスに対する腫瘍血管新生誘導阻害実験

このワクチンによる腫瘍血管新生への抑制効果を見るために、マウス(C57BL/6)にワクチン接種を行い、マウスルイス肺癌(LLC)を封入したチャンバーをマウスの背部

皮下に挿入し(背部皮下法)、チャンバーと接する皮下に誘導された血管新生を観察した。

#### 【0039】ワクチン接種

8週令の雄マウス(C57BL/6)に実施例1と同様にワクチン接種を行い、対照も同様に、アジュバント対照群とバッファ対照群とを準備した。

#### 【0040】チャンバーの作製

ミリポアリング(#PR0001401 ミリポア社)の両面に接着剤(#XX7000000 ミリポア社)で $0.45 \mu\text{m}$ フィルター(#HAWP0400 ミリポア社)を貼り風乾した。チャンバー移植時に、DMEM 10%FBSを用いて培養しておいたLLC細胞を $6.6 \times 10^7$ 個/mlに調製し、0.15mlずつ( $1 \times 10^7$ 個/チャンバー)風乾しておいたチャンバーに入れ、ナイロン棒で栓をした。この対照として、リン酸緩衝液(PBS)を封入したチャンバーも用意した。

#### 【0041】チャンバーの移植

ワクチン接種後9週目のマウスをネブタールで麻酔し腹臥位に保定、尾根部より頭側に約1cmのところの皮膚をチャンバーが挿入できる程度(約1.5cm)に切開し、リングピンセットを用いて皮下にチャンバーを挿入できるよう空間を作り、前述のチャンバーを側腹部まで挿入した。切開創を縫合器で閉じ、ヨードチンキ液で消毒した。それぞれのマウスの左背にLLC細胞入りチャンバー、右背にPBS入りチャンバーを挿入した。

#### 【0042】腫瘍血管新生の観察

チャンバー移植後4日目に、チャンバーに接する皮下において誘導された血管新生を観察した。この結果を図5に示す。図5において、(a)はバッファ対照群におけるPBS(リン酸緩衝液)を入れたチャンバーに接する皮下、(b)はアジュバント対照群におけるPBSを入れたチャンバーに接する皮下、(c)はワクチン接種群におけるPBSを入れたチャンバーに接する皮下、(d)はバッファ対照群におけるルイス肺癌細胞を入れたチャンバーに接する皮下、(e)はアジュバント対照群におけるルイス肺癌細胞を入れたチャンバーに接する皮下、(f)はワクチン接種群におけるルイス肺癌細胞を入れたチャンバーに接する皮下をそれぞれ示すものである。この図からどの群のマウスにおいても、PBS入りチャンバーに接する皮下には血管新生は観察されなかった〔図5 a, b, c 参照〕。バッファ対照マウスとアジュバント対照マウスのLLC細胞入りチャンバーに接する皮下には著しい血管新生が観察された〔図5 d, e 参照〕のに対し、ワクチン接種マウスのLLC細胞入りチャンバーに接する皮下には血管新生は観察されなかった〔図5 f 参照〕。なお、図5において、PBSはリン酸緩衝液生理食塩水を、LLCはマウスルイス肺癌を、FCAはフロイントのコンプライートアジュバント投与群を、bVEGFはバキュロウイルスで作製した VEGF<sub>121</sub>をそれぞれ示す。

#### 【0043】

【発明の効果】本発明のワクチン、特にVEGF/VPFを含む

ワクチンを生体に接種することにより生体そのものの持つ免疫応答を引き出し、その結果VEGF/VPFが重要な役割を果たしていると考えられている腫瘍増殖等に於ける血管新生を抑制し、例えば腫瘍や腫瘍血管を攻撃し、抗腫瘍効果が得られるものであり、さらに、腫瘍の予防や治療に関して以下のような効果も期待できる。

【0044】1. 個体に予めVEGF/VPFを含むワクチンを接種しておくことによって、自然発生的に生成してくる腫瘍を大きくさせない、腫瘍の顕在化を著しく遅延させるという、疾病としての癌発症の予防効果が期待できる。

2. 癌転移は原発性の癌由来の癌細胞が異所に於いて増殖することによって成立する。この場合にも転移成立、すなわち異所での癌細胞増殖、のカギを握っているものが、血管新生であると考えられ、外科的に癌を切除の前後に、VEGF/VPFを含むワクチン接種を行っておくことによって、原発性の癌の場合と同様に異所に於いて生成し

てくる癌腫を大きくさせない、癌腫の顕在化を著しく遅延させるという、癌転移の予防効果が期待できる。

【0045】3. 癌細胞の多くはVEGF/VPFを生成し、腫瘍血管の内皮細胞上に近傍の癌から分泌されたと思われるVEGF/VPFの蓄積が観察されることが知られており、これら癌細胞そのものや腫瘍血管内皮細胞が細胞障害性免疫応答の標的となりうる。そこで既に腫瘍血管の新生を伴う固形癌の治療にも、癌免疫療法の一つとして本ワクチン接種が有効であると期待できる。

【0046】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：121

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys
1				5				10						15	
Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu
20						25						30			
Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys
35							40					45			
Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu
50						55					60				
Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile
65					70					75				80	
Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe
					85				90					95	
Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg
				100				105					110		
Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys	Ser							
				115				120							

【図面の簡単な説明】

【図1】マウス血中抗VEGF/VPF抗体価の平均値の推移を示す図である。

【図2】癌の増殖の平均値の推移を示す図である。

【図3】マウス血中抗VEGF/VPF抗体価の平均値の推移を

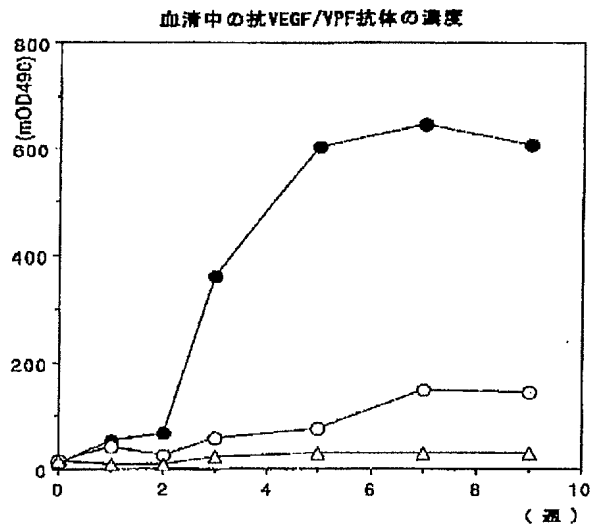
示す図である。

【図4】癌の生着コロニー数の平均値を示す図である。

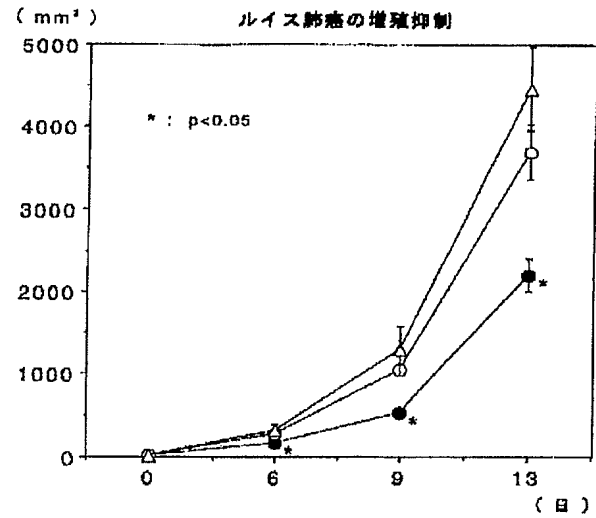
【図5】ワクチン接種したマウスへの腫瘍血管新生誘導実験におけるチャンバーに接する皮下（生物の形態）の写真である。



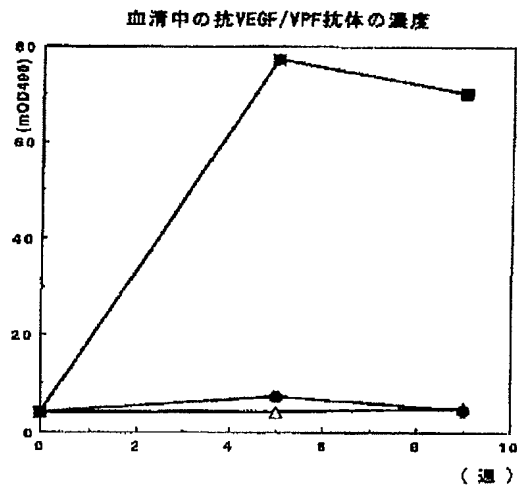
【図1】



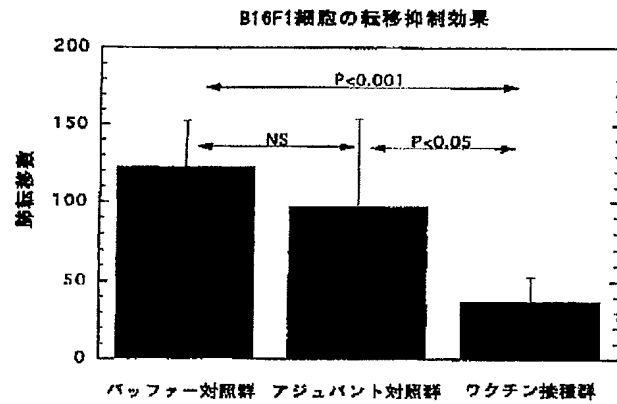
【図2】



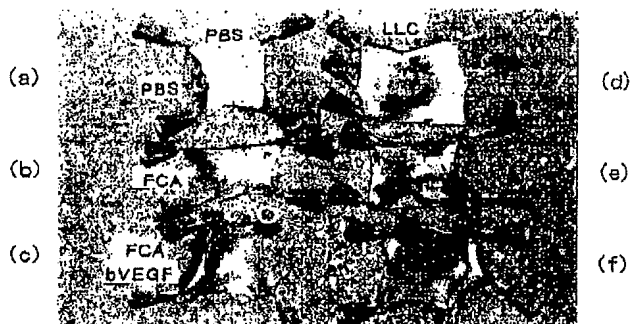
【図3】



【図4】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成8年6月6日

【補正方法】変更

【手続補正1】

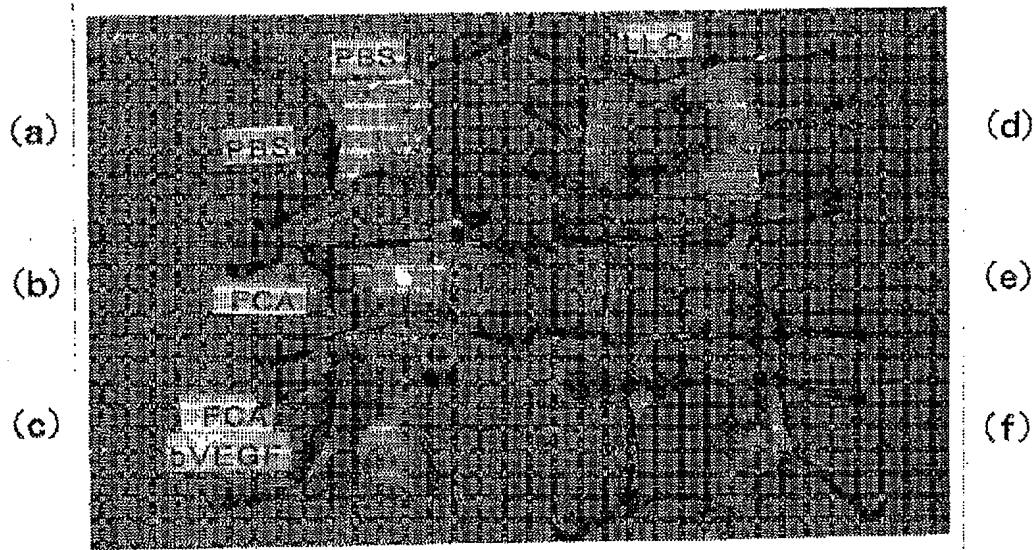
【補正内容】

【補正対象書類名】図面

【図5】

【補正対象項目名】図5

図面代用写真



フロントページの続き

(72)発明者 幸田 綾子  
茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式  
会社つくば研究所内

(72)発明者 瀬川 俊章  
茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式  
会社つくば研究所内